

COVER PAGE CREATED BY RODNEY PATENTS - TO AVOID HAVING THIS PAGE CREATED IN THE  
FUTURE UNCHECK THE 'CREATE A COVER PAGE' AT THE DATA ENTRY PAGE

DE10204053

**New synthetic long-chain tetraether derivatives, useful as  
components of liposomes for nucleic acid transfection**

Patent number: DE10204053

Publication date: 2003-08-14

Inventor: KUEHL CHRISTINE (DE)

Applicant: BERNINA BIOSYSTEMS GMBH (DE)

Classification:

- international: C07C43/13

- european:

Application number: DE20021004053 20020201

Priority number(s): DE20021004053 20020201

Abstract of **DE10204053**

Synthetic long-chain tetraether derivatives (I) are new. Synthetic long-chain tetraether derivatives of formula (I) and their salts are new.  $g = 11-15$ , preferably  $12-14$ ;  $h = 13-17$ , preferably  $14-16$ ;  $R, R_{10}, R_{11}, R_{111} = H$  or  $Me$ ;  $S_1, S_2 = \text{tert-butyl dimethylsilyl, tert-butyl diphenylsilyl, trityl, hydroxymethyl, tetrahydropyranyloxymethyl, benzyloxymethyl, or } -A-(X_1)_r-B'-(X_2)_q-Y$ ;  $A = \text{CONR}_1, \text{COO, CH}_2\text{O, CH}_2\text{OCO, CH}_2\text{OCOO, CH}_2\text{NR}_1\text{CO, CH}_2\text{OCONR}_1, \text{CH}_2\text{NR}_1\text{COO, } -\text{CON}((\text{CH}_2)_m\text{Y})-, \text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_m\text{O, CONH}(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m\text{O, CH}_2\text{COO, CH}_2\text{O}(\text{PO}_2\text{R}_1)\text{O or CH}_2\text{S}$ ;  $X_1, X_2 = 1-20\text{C linear or branched alkylene or alkenylene, COC(R}_1)(\text{Y})(\text{CH}_2)_m, (\text{CH}_2)_m\text{NHCO, } (\text{CH}_2)_m\text{NHCOCH(Y), } (\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{NHCOCH(Y), } ((\text{CH}_2)_m\text{O})_n, ((\text{CH}_2)_m\text{O})_n\text{CO, } (\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m\text{CO, } (\text{CH}_2)_m, (\text{CH}_2)_m\text{CO, } (\text{CH}_2)_m\text{NH or } (\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m$ ;  $B' = ((\text{CH}_2)_m\text{O})_n, (\text{O}(\text{CH}_2)_m)_n, (\text{N(R}_1)\text{COCHN(R}_1)_2)_o$  or  $(\text{N(R}_6))_p$ ;  $Y = H, R_2, \text{N(R}_2)\text{R}_3, \text{N+R}_2\text{R}_3\text{R}_4, \text{N}((\text{CH}_2)_m\text{Y})_2, \text{NR}_2(\text{CH}_2)_m\text{Y, OR}_5, \text{COR}_7, \text{NHC(NH)NH}_2, \text{NHCOY or SR}_8$  (sic);  $R_1, R_6 = H, 1-12\text{C linear, branched or cyclic alkyl, alkenyl, aralkyl or aryl, optionally substituted by at least one Y, or } (\text{CH}_2)_m\text{NHR}_2$ ;  $R_2-R_5, R_7, R_8 = R_1, (\text{C=N+H}_2)\text{NH}_2$  or a ligand (bound to the lipid through a spacer);  $m = 1-5$ ;  $n = 0-150$ ;  $o = 0-10$ ;  $p, r = 0-1$ ; and  $q = 0-5$ . Independent claims are also included for: (1) preparation of (I); and (2) intermediates of formula (II).  $\text{grp} = \text{tosylate, triflate, OH, phenoxy, benzyloxy, bromomagnesium, I, Br or Cl}$ .

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift

⑩ DE 102 04 053 A 1

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C 07 C 43/13

②① Aktenzeichen: 102 04 053.2  
②② Anmeldetag: 1. 2. 2002  
④③ Offenlegungstag: 14. 8. 2003

DE 102 04 053 A 1

⑦① Anmelder:  
Bernina Biosystems GmbH, 82327 Tutzing, DE

⑦④ Vertreter:  
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,  
80538 München

⑦② Erfinder:  
Kühl, Christine, 82152 Planegg, DE

⑤⑤ Entgegenhaltungen:  
DE 197 36 592 A1  
DE 196 07 722 A1  
US 50 98 588  
J. Org. Chem. (1998), 63(3), S. 2689-2698;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Synthetische Tetraether und Herstellungsverfahren dafür

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung stellt neuartige synthetische Tetraether und ein neues Herstellungsverfahren für diese Substanzen zur Verfügung. Die erfindungsgemäßen Tetraether zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch das vorgestellte Syntheseverfahren einfach und gezielt modifiziert werden können, was die Synthese von gewünschten Modellsubstanzen ermöglicht. Das Synthesekonzept sichert dabei eine hohe Variabilität bei gleichzeitiger Einfachheit der Herstellung.

DE 102 04 053 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft synthetische Tetraether, Herstellungsverfahren dafür und Zwischenprodukte, nützlich für die Synthese der Tetraether.

- 5 [0002] In der wissenschaftlichen Forschung besteht ein großer Bedarf an Verfahren zur Transfektion von Zellen in Zellkultur und von multizellulären Organismen mit Nukleinsäuren. Die herkömmlichen Verfahren wie Elektroporation, DEAE- und "Calciumphosphat"-unterstützte Transfektion, Mikroinjektion oder ballistische Methoden haben den Nachteil, daß sie oft nur geringe Transfektionseffizienzen erreichen, die Zellüberlebensraten sehr gering sind und/oder, daß sie nicht an Mehrzellern durchführbar sind. Virale und retrovirale Transfektionssysteme sind zwar effizienter, bergen aber  
10 eigene Risiken, wie z. B. eine erhöhte Immunantwort oder eine unkontrollierte Integration in das Zielgenom. Die Transfektion von nicht-viralen Nukleinsäuren mit Hilfe von Liposomen, auch Lipofektion genannt, stellt daher eine erfolgreiche und bereits häufig angewandte Alternative zu den oben beschriebenen Verfahren dar.

- [0003] Liposomen sind künstlich hergestellte uni- oder multilamellare Lipidvesikel, die einen wäßrigen Innenraum umschließen. Eventuell im wäßrigen Innenraum des Liposoms enthaltene Verbindungen sind weitgehend gegen proteolytische oder nukleolytische Angriffe geschützt. Die Lipidvesikel sind im allgemeinen biologischen Membranen ähnlich und werden daher nach Anlagerung an dieselben oftmals leicht in die Membranstruktur integriert. Bei dieser Membranfusion wird der Inhalt des Liposomeninnenraums in das von der biologischen Membran umschlossene Lumen entladen. Alternativ werden die Liposomen nach endocytotischer Aufnahme in den Lysosomen der Zellen abgebaut. Der dort freigesetzte Inhalt des Liposomeninnenraumes kann dann von dort in das Cytosol der Zelle übertreten.

- 20 [0004] Liposomen können daher als Transportvehikel benutzt werden. Neben der bereits erwähnten Verwendung als Lipofektionsmittel, d. h. als Transportvehikel für Nukleinsäuren, werden Liposomen vielfach als Transportvehikel für Therapeutika eingesetzt. Für diese unter dem Stichwort "drug delivery" bekannt gewordene Funktion werden hydrophile Therapeutika, z. B. "small molecules", Peptide oder Proteine im wässrigen Innenraum des Liposoms verpackt und/oder hydrophobe Verbindungen in die hydrophobe Matrix, d. h. die Lipidschicht der Liposomen eingebaut. So stellt z. B. die  
25 Kosmetikindustrie Liposomen-haltige Hautcremes her, die Wirkstoffe in die Epidermis und tiefer gelegene Zellschichten transportieren. Eine zielgerichtete Abgabe der von den Liposomen transportierten Wirkstoffe an bestimmte Zellen oder ihrer Anreicherung in der Nähe solcher Zielzellen kann in diesem Zusammenhang beispielsweise durch an die Außenmembran der Liposomen gekoppelte Antikörper für bestimmte Zelloberflächenstrukturen oder andere "Targeting"-Einheiten erreicht werden.

- 30 [0005] Zur Herstellung von Liposomen werden hauptsächlich natürliche Lecithine aus Sojabohnen oder Eigelb bzw. definierte natürliche oder künstliche Phospholipide, wie Cardiolipin, Sphingomyelin, Lysolecithin und andere verwendet. Durch Variation der polaren Kopfgruppen (Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerin, Inosit), der Länge und der Sättigungsgrade der Kohlenwasserstoffketten werden Größe, Stabilität und Fähigkeit zur Aufnahme und Freisetzung der assoziierten Moleküle beeinflußt.

- 35 [0006] Einer der wesentlichen Nachteile der heute üblichen Liposomen ist ihre geringe Stabilität. Aus normalen Doppelschicht-bildenden Phospholipiden gebildete Liposomen sind auch im gekühlten Zustand nur kurze Zeit haltbar. Ihre Lagerstabilität läßt sich zwar z. B. durch Einbeziehen von Phosphatidsäure o.  $\alpha$ -Tocopherol erhöhen, jedoch ist die somit verbesserte Stabilität für viele Zwecke immer noch unzureichend. Außerdem sind herkömmliche Liposomen nicht säurestabil und daher weder für den Transport pharmazeutischer Wirkstoffe geeignet, die nach oraler Verabreichung den  
40 Magen passieren, noch für die Liposomenunterstützte DNA-Transfektion unter leicht sauren pH-Bedingungen.

- [0007] Für wissenschaftliche und medizinische Lipofektionen in Säugerzellen werden Liposomenbildende Lipidmischungen, z. B. Lipofectamin®, Lipofectin® oder DOTAP®, häufig benutzt. Neben den bereits erwähnten Nachteilen ist mit ihrer Anwendung die Notwendigkeit verbunden, eine Vielzahl von Parametern (z. B. Zelldichte, Nukleinsäuremenge, Anteil der zugesetzten Lipide, Volumen des Liposomenansatzes etc.) genau zu bestimmen, weil es nur ein sehr  
45 enges Parameteroptimum gibt, bei dem ausreichende Transfektionseffizienzen erreicht werden können. Dadurch werden Transfektionen unter Verwendung kommerzieller Lipofektionsreagenzien sehr aufwendig und kostenintensiv. Desweiteren sind bei den oben genannten Produkten große Variationen zwischen den einzelnen Chargen zu beobachten, was sie in der Praxis wenig verläßlich macht.

- 50 [0008] Die WO-A-97/31927 (DE-A-196 07 722) beschreibt ein Tetraetherlipidderivat, das eine Seitenkette mit einem modifizierten oder unmodifizierten Guloserest oder einem Oxidationsprodukt einer solchen Gulose umfaßt, sowie dieses Tetraetherlipidderivat enthaltende Liposomen, die sich durch eine verbesserte Beständigkeit gegenüber Säuren und durch eine verbesserte Lagerstabilität auszeichnen.

- [0009] Das US-Patent 5098588 beschreibt die Herstellung von Tetraetherlipidderivaten mit polaren Seitenketten und deren Verwendung als Grenzflächenschmiermittel.

- 55 [0010] Die WO-A-99/10337 (DE-A-197 36 592) beschreibt Tetraetherlipidderivate mit Seitenketten, die entweder per se durch Ausbildung quaternärer Ammoniumsalze oder unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind. Solcherart derivatisierte Lipide sind geeignet, mit negativ geladenen Molekülen, beispielsweise Nukleinsäuremolekülen, in Kontakt zu treten und sie z. B. in Liposomen einzuschließen.

- 60 [0011] J. Org. Chem. (1998), 63(8), 2689-2698 beschreibt die Totalsynthese von speziellen 72-gliedrigen makrozyklischen Tetraetherlipiden durch die Kombination der funktionalen halben Dietherverbindungen.

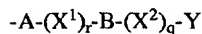
- [0012] Die Nachteile des Standes der Technik liegen darin, dass entweder in komplexen und aufwendigen Verfahren die gewünschten Tetraether aus natürlichen Quellen gewonnen werden müssen oder aber die synthetischen Tetraether durch aufwendige Syntheseverfahren hergestellt werden müssen. Dies ist insbesondere dann nachteilhaft, wenn es gewünscht ist durch einfach zu erhaltene Modellsubstanzen Untersuchungen durchzuführen, die voraussetzen, dass größere  
65 Mengen an Tetraethern einfach synthetisierbar sind, wobei insbesondere auch das Herstellungsverfahren eine gezielte und einfache Variation von Substitutionsmustern, Kettenlängen und sterischen Konfigurationen erlaubt.

[0013] Es ist also die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die oben genannten Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

[0014] Dies erreicht die vorliegende Erfindung durch die Bereitstellung des Tetraethers nach Anspruch 1. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen angegeben. Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung ein Herstellungsverfahren für den Tetraether der Erfindung zur Verfügung, gekennzeichnet durch die Verfahrensstufen nach Anspruch 8. Bevorzugte Ausführungsformen sind wiederum in den Unteransprüchen angegeben. Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung ein Zwischenprodukt zur Verfügung, definiert wie in Anspruch 13 angegeben, nützlich zur Herstellung des Tetraethers der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Ausgestaltungen des Zwischenprodukts sind in den Unteransprüchen angegeben.

[0015] Im folgenden wird die vorliegende Erfindung weiter beschrieben, zunächst bezogen auf den Tetraether der vorliegenden Erfindung. Die gemachten Ausführungen, insbesondere auf Substituenten der gleichen Benennung, gelten entsprechend auch für das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren und das erfindungsgemäße Zwischenprodukt.

[0016]  $S^1$  und  $S^2$ , die gleich oder verschieden sein können, sind  $-CH_2OH$ ,  $-CH_2OTHP$  (THP = Tetrahydropyran) oder  $-CH_2OBenzyl$  oder können durch die folgende Formel dargestellt werden:



worin bedeuten:

A  $-\text{CONR}^1-$ ,  $-\text{COO}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCO}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCOO}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^1\text{CO}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCONR}^1-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^1\text{COO}-$ ,  $-\text{CON}[(\text{CH}_2)_m\text{Y}]-$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_m\text{O}-$ ,  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{COO}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{PO}_2\text{R}^1)\text{O}-$  oder  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $X^1$  und  $X^2$  unabhängig voneinander eine verzweigte oder unverzweigte Alkyl- oder Alkenylengruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen,  $-\text{COCR}^1\text{Y}(\text{CH}_2)_m-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCOCHY}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{NHCOCHY}-$ ,  $[(\text{CH}_2)_m\text{O}]_n-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{O}]_n\text{CO}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NH}-$  oder  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m-$ ,

B  $-(\text{CH}_2)_m\text{O}]_n-$ ,  $-(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_n-$ ,  $-(\text{NR}^1\text{COCHN}(\text{R}^1)_2)_o-$  oder  $-(\text{NR}^6)_p-$ ,

Y  $-\text{H}$ ,  $-\text{R}^2$ ,  $-\text{NR}^2\text{R}^3$ ,  $-\text{N}^+\text{R}^2\text{R}^3\text{R}^4$ ,  $-\text{N}[(\text{CH}_2)_m\text{Y}]_2$ ,  $-\text{NR}^2(\text{CH}_2)_m\text{Y}$ ,  $-\text{OR}^5$ ,  $-\text{COR}^7$ ,  $-\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCOY}$  oder  $-\text{SR}^8$ , wobei Y innerhalb einer Gruppe verschiedene Bedeutungen haben kann,  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^6$   $-\text{H}$ , eine geradkettige, verzweigte oder cyclische Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei diese Gruppen mit mindestens einer Gruppe Y substituiert sein können, oder  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHR}^2$ ,  $\text{R}^2$  bis  $\text{R}^5$ ,

$\text{R}^7$  und  $\text{R}^8$  unabhängig voneinander  $\text{R}^1$  oder  $-(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)\text{NH}_2$ ,

m 1 bis 5, wobei m innerhalb einer Gruppe verschiedene Werte annehmen kann,

n 0 bis 150,

o 0 bis 10,

p 0 oder 1,

q 0 bis 5 und

r 0 oder 1,

wobei jeweils einer der Reste  $\text{R}^2$  bis  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^7$  und  $\text{R}^8$  weiter einen Liganden umfassen kann, der über einen Spacer an das Lipid gebunden sein kann.

[0017] Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, daß  $S^1$  und  $S^2$  unabhängig voneinander für eine der folgenden Gruppen stehen:

$-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{R}^1\text{R}^2$ ,  $-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{R}^1-(\text{CH}_2)_m-\text{Y}$ ,  $-\text{COOR}^3$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-\text{COOR}^3$ ,  $-\text{CH}_2\text{OR}^3$ ,  $-\text{CONH}-\text{D}$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CONH}-\text{D}$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{D}$ ,  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{D}$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-\text{D}$ ,  $-\text{COO}-\text{D}$ ,  $-\text{CON}[(\text{CH}_2)_m-\text{Y}]-\text{D}$ ;

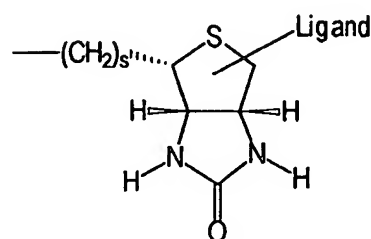
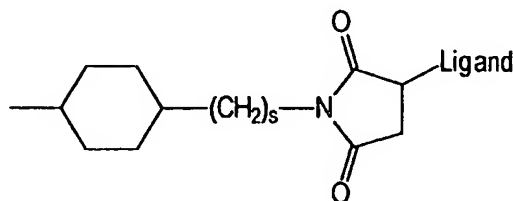
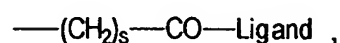
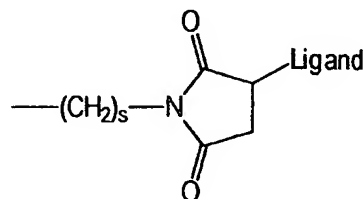
worin bedeuten:

D  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{E}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m-\text{Y}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}-\text{CHY}-(\text{CH}_2)_m-\text{Y}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{N}[(\text{CH}_2)_m-\text{Y}]_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_m-\text{Y}$ ;

E  $-\text{R}^4$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}-\text{Z}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^4-\text{Ligand}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{CO}-\text{Ligand}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-\text{Ligand}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m-\text{Y}$ ;

Y  $-\text{NR}^4\text{R}^5$ ,  $-\text{N}^+\text{R}^4\text{R}^5\text{R}^6$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ;

Z



$\text{R}^1$  bis  $\text{R}^6$  unabhängig voneinander  $-\text{H}$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$ ;

m eine ganze Zahl von 1 bis 4 und

s eine ganze Zahl von 1 bis 4.

[0018] Bevorzugte Kombinationen von  $S^1$  und  $S^2$  umfassen:

$S^1 = -\text{CONH-D}$ ,  $-\text{COO-D}$  oder  $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_m-\text{O-D}$  und  $S^2 = -\text{COOR}^3$ ; oder

$S^1 = -\text{CH}_2\text{O-CONH-D}$ ,  $-\text{CH}_2\text{O-D}$  oder  $-\text{CH}_2\text{O-CO}-(\text{CH}_2)_m-\text{O-D}$  und  $S^2 = -\text{CH}_2\text{OR}^3$ .

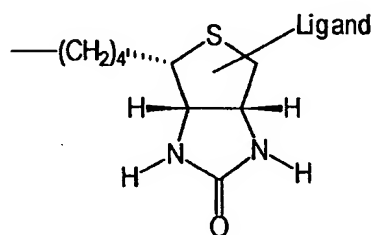
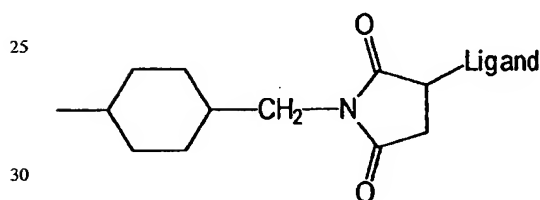
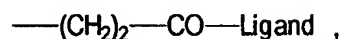
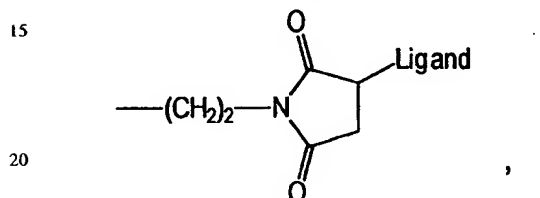
[0019] Bevorzugte Gruppen, die durch D dargestellt werden, umfassen  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{E}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3-\text{Y}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCO-CHY}-(\text{CH}_2)_3-\text{Y}$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-\text{N}[(\text{CH}_2)_2-\text{Y}]_2$  und  $-(\text{CH}_2)_4-\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_3-\text{Y}$ .

[0020] Besonders bevorzugte Gruppen, die durch D dargestellt werden, umfassen  $-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{R}^5)_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{R}^5)_3$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCO-CH}[\text{N}(\text{R}^5)_2]-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{R}^5)_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-\text{N}[(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{R}^5)_2]_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-\text{N}[(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{R}^5)_3]_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{R}^5)_2$  und  $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{R}^5)_3$ .

[0021] Bevorzugte Gruppen, die durch E dargestellt werden, umfassen  $-(\text{CH}_2)_2-\text{Y}$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-\text{NHCO-Z}$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-\text{NR}^4-\text{Ligand}$  und  $-(\text{CH}_2)_m-\text{CO-Ligand}$ .

[0022] Bevorzugte Gruppen, die durch Y dargestellt werden, umfassen  $-\text{NHR}^5$ ,  $-\text{N}(\text{R}^5)_2$ ,  $-\text{N}^+(\text{R}^5)_3$  und  $-\text{NH-C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ , wobei die Gruppen  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  und  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  besonders bevorzugt sind.

[0023] Bevorzugte Gruppen, die durch Z dargestellt werden, umfassen:



[0024] Die Gruppen  $X^1$  und  $X^2$  sind bevorzugt geradkettige Alkylengruppen mit 1 bis 12, bevorzugt mit 1 bis 6 und besonders bevorzugt mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispiele für bevorzugte Gruppen umfassen  $-(\text{CH}_2)-$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-(\text{CH}_2)_3-$  und  $-(\text{CH}_2)_4-$ .

[0025] Bevorzugte Gruppen, die durch  $R^1$  und  $R^6$  dargestellt werden, umfassen Wasserstoff und Alkylgruppen mit 1 bis 6, besonders bevorzugt mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, wie z. B. eine Methylgruppe, eine Ethylgruppe oder eine n-Propylgruppe, die mit mindestens einer Gruppe Y substituiert sein können. Besonders bevorzugte Beispiele für die substituierten und unsubstituierten Alkylgruppen, die durch  $R^1$  und  $R^6$  dargestellt sind, umfassen  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  und  $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ .

[0026] Bevorzugte Beispiele für die Gruppen, die durch  $R^2$  bis  $R^7$ ,  $R^1$  und  $R^8$  dargestellt sind, umfassen die bevorzugten Gruppen, die für  $R^1$  genannt wurden, sowie die Gruppe  $-(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)\text{NH}_2$ .

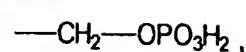
m ist bevorzugt eine Zahl im Bereich von 1 bis 3, besonders bevorzugt 2 oder 3.

n ist bevorzugt eine Zahl im Bereich von 3 bis 130 und ganz besonders bevorzugt eine Zahl im Bereich von 40 bis 85.

o ist bevorzugt eine Zahl im Bereich von 0 bis 3, besonders bevorzugt 0 oder 1.

q ist bevorzugt 0 oder 1.

[0027] Entsprechend einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind  $S^1$  und  $S^2$  unabhängig voneinander ausgewählt aus den folgenden Gruppen:



35

40

45

50

55

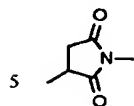
33

60

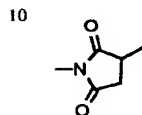
65

65

COO-, -CONH-, -CSNH-,  $(CN^+H_2)$ -, -NH- und



W eine Gruppe, die an den Liganden gekoppelt ist und die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus -O-, -S-, -CO-, -OCO-, -NHCO-, -NHCS-,  $(CN^+H_2)$ -, -NH- und



15  
V

- (a) eine verzweigte oder unverzweigte Alkylenkette mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen, wobei die Kohlenstoffatome teilweise durch die Gruppen -S-S-, -CO-, -CH(OH)-, -NHCO-, -CONH-, Cyclohexylen, Phenylen, -COO-, -OCO-, -SO<sub>2</sub>-, -O- oder -CH(CH<sub>3</sub>)- ersetzt sein können, und/oder
- (b) eine Polyethylen/propylenglycolkette mit mindestens 3 Ethylen/propylenglycoleinheiten, und/oder
- (c) eine Polyethylen/propylenaminkette mit mindestens 3 Ethylen/propylenamineinheiten, und/oder
- (d) eine Kohlenhydratkette, und/oder
- (e) eine Oligopeptidkette und/oder
- (f) eine Polylactidkette,

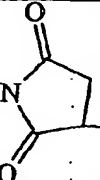

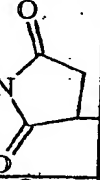


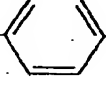
k 0 oder 1 und

l 0 oder 1.

[0031] Bevorzugte Verknüpfungsgruppen zwischen Lipid und Ligand sind im Folgenden aufgeführt.

Lipid	Spacer	Ligand	
$\text{—NH—CO—}$	$\text{—}^*$	$\text{—CO—NH—}$	5
$\text{—NH—COO—}$	$\text{—}^*$	$\text{—OCO—NH—}$	10
$\text{—CO—NH—}$	$\text{—}^*$	$\text{—NH—CO—}$	15
$\text{—O—CO—}$	$\text{—}^*$	$\text{—CO—O—}$	20
$\text{—O—CONH—}$	$\text{—}^*$	$\text{—NHCO—O—}$	25
$\text{—NH—CONH—}$	$\text{—}^*$	$\text{—NHCO—NH—}$	30
$\text{—NH—CSNH—}$	$\text{—}^*$	$\text{—NHCS—NH—}$	35
$\text{—NH—(C=N}^+\text{H}_2\text{)—}$	$\text{—}^*$	$\text{—(C=N}^+\text{H}_2\text{)—NH—}$	40
			45
			50
			55
			60
			65



Lipid	Spacer	Ligand
—NH—	* —	NH—
—NH—CO—	* —NHCOCH <sub>2</sub> —N— 	—S—
—NH—CO—	* —NHCO—  —CH <sub>2</sub> —N— 	—S—
—NH—CO—	* —NHCO—  —N— 	—S—
—NH—CO—	* —NHCO—  —CH(CH <sub>3</sub> )—S—S—	
—NH—CO—	* —NHCO—CH <sub>2</sub> —S—	
—NH—CO—	* —NHCO—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> —S—S—	
—CO—O—	* —O—CO—	

worin \* eine zweiwertige Verbindungsgruppe ist. Bevorzugte Beispiele für die zweiwertige Verbindungsgruppe umfassen (a) eine verzweigte oder unverzweigte Alkylenkette mit 1 bis 30, bevorzugt mit 1 bis 18 und besonders bevorzugt mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei die Kohlenstoffatome teilweise durch die Gruppen -S-S-, -CO-, -CH(OH)-, -NHCO-, -CONH-, Cyclohexylen, Phenylen, -COO-, -OCO-, -SO<sub>2</sub>-, -O- oder -CH(CH<sub>3</sub>)- ersetzt sein können, (b) eine Polyethylen/propylenglycolkette mit mindestens 3 Ethylen/propylenglycoleinheiten, die verzweigt sein kann, (c) eine Polyethylen/propylenaminkette mit mindestens 3 Ethylen/propylenamineinheiten, die verzweigt sein kann, (d) eine oligomere oder polymere Kohlenhydratkette, (e) eine Peptidkette, bevorzugt eine Oligopeptidkette mit 5 bis 50 Aminosäuren, be-

vorzugt mit 5 bis 15 Aminosäuren, (f) eine Polylactidkette, (g) eine Poly(acrylmorpholin)kette, (h) eine Poly(vinylpyrrolidon)kette und (i) eine Poly(acrylamid)kette. Besonders bevorzugte Beispiele für die zweiwertige Verbindungsgruppe umfassen die Gruppen  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$ ,  $-(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)(\text{CH}_2)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_2(\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2)-$ ,  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_6\text{SS}(\text{CH}_2)_5\text{CO}-$ ,  $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CO}-$ ,  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$  und  $-\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_2(\text{CH}_2)_2\text{OCO}-$ .

[0032] Die Materialien, die verwendet werden können, um einen Spacer in die erfindungsgemäßen Tetraetherlipide einzuführen, umfassen handelsüblich erhältliche Produkte. Beispielsweise können die Produkte AEDP (Produktnr. 22101ZZ), AMAS (Produktnr. 22295ZZ), BMB (Produktnr. 22331ZZ), BMDB (Produktnr. 22332ZZ), BMH (Produktnr. 22330ZZ), BMOE (Produktnr. 22323ZZ), BMPA (Produktnr. 22296ZZ), BMPH (Produktnr. 22297ZZ), BMPS (Produktnr. 22298ZZ), BM[PEO]<sub>3</sub> (Produktnr. 22336ZZ), BM[PEO]<sub>4</sub> (Produktnr. 22337ZZ), DMA (Produktnr. 20663ZZ), DMP (Produktnr. 21666ZZ), DMS (Produktnr. 20700ZZ), DPDPB (Produktnr. 21702ZZ), DSG (Produktnr. 20593ZZ), DSP (Produktnr. 22585ZZ), DSS (Produktnr. 21555ZZ), DST (Produktnr. 20589ZZ), DTBP (Produktnr. 20665ZZ), DTME (Produktnr. 22335ZZ), DTSSP (Produktnr. 21578ZZ), EDC (Produktnr. 22980ZZ), EGS (Produktnr. 21565ZZ), EMCA (Produktnr. 22306ZZ), EMCS (Produktnr. 22308ZZ), GMBS (Produktnr. 22309ZZ), KMUA (Produktnr. 22211ZZ), LC-SMCC (Produktnr. 22362ZZ), LC-SPDP (Produktnr. 21651ZZ), MBS (Produktnr. 22311ZZ), MSA (Produktnr. 22605ZZ), PMPI (Produktnr. 28100ZZ), SATA (Produktnr. 26102ZZ), SATP (Produktnr. 26100ZZ), SBAP (Produktnr. 22339ZZ), SIA (Produktnr. 22349ZZ), SIAB (Produktnr. 22329ZZ), SMCC (Produktnr. 22360ZZ), SMPB (Produktnr. 22416ZZ), SMPH (Produktnr. 22363ZZ), SMPT (Produktnr. 21558ZZ), SPDP (Produktnr. 21857ZZ), Sulfo-BSOCOES (Produktnr. 21556ZZ), Sulfo-LC-SMPT (Produktnr. 21568ZZ) und TFCS (Produktnr. 22299ZZ) der Firma PIERCE (die Produktnummern wurden dem Produktkatalog 1999/2000 entnommen) eingesetzt werden.

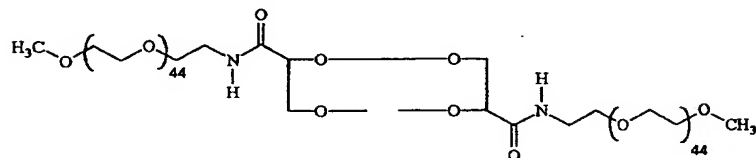
[0033] Die Gruppen S<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> können Polyethylenglycolketten enthalten. Die Materialien, die verwendet werden können, um Polyethylenglycolketten in die erfindungsgemäßen Tetraetherlipide einzuführen, umfassen handelsüblich erhältliche Produkte. Polyethylenglycolketten werden z. B. mit durchschnittlichen Molmassen von 500 g/mol (durchschnittlich 11 Ethylenglycoleinheiten), 1000 g/mol (durchschnittlich 23 Ethylenglycoleinheiten), 2000 g/mol (durchschnittlich 45 Ethylenglycoleinheiten), 3400 g/mol (durchschnittlich 77 Ethylenglycoleinheiten) und 5000 g/mol (durchschnittlich 114 Ethylenglycoleinheiten) angeboten. Diese Materialien werden erfindungsgemäß bevorzugt verwendet.

[0034] Die Zirkulationszeit von Liposomen im Blut läßt sich durch den Einbau von Lipiden mit Polyethylenglycolketten (PEG-Ketten) erhöhen, d. h. Liposomen, die solche pegylierten Lipide enthalten, haben eine höhere Lebensdauer in vivo als Liposomen mit nicht pegylierten Lipiden. Einerseits wird die Opsonisierung der Vesikel verhindert und dadurch die Erkennung durch das retikuloendotheliale System. Zum anderen wird auch die Entfernung der einzelnen Lipide durch HDL-Komplexe unterdrückt. Die PEG-Ketten besitzen vorzugsweise Molgewichte von 2000, 3400 oder 5000 Masseneinheiten.

[0035] Es hat sich gezeigt, daß die Zirkulationszeit am höchsten ist, wenn das pegylierte Lipid gut in der Liposomen-Membran verankert ist. Dabei ist es bevorzugt, daß die Bindung zwischen dem Lipid und dem PEG-Teil eine hohe Stabilität besitzt.

[0036] Durch den membranspannenden Tetraether sind die Tetraetherlipide besser in der Liposomenmembran verankert. Damit lassen sich PEG-Ketten, die über stabile Bindungen an die TEL gekoppelt sind, besser in der Liposomenmembran verankern als bei herkömmlichen Lipiden.

[0037] Bevorzugt werden hierfür bis-pegylierte TEL-Derivate bereitgestellt. Der Tetraether-Grundkörper ist über Säureamid-Funktionen mit zwei Molekülen PEG, vorzugsweise der Molmasse 2000, verknüpft (II).

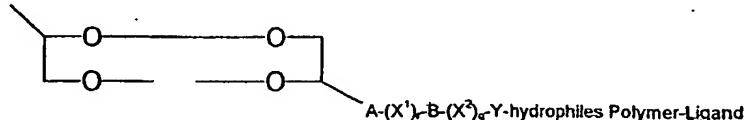


[0038] Ein solches Molekül zeigt auf Grund des membranspannenden, hydrophoben Tetraether-Grundgerüsts eine bessere Verankerung in der Liposomen-Membran als z. B. die pegylierten PE(Phosphatidylethanolamin)-Lipide. Außerdem ist ein Entfernen eines solchen bipolaren Lipids aus der Liposomen-Membran auf Grund der zweiten, voluminösen, hydrophilen Kopfgruppe zusätzlich erschwert. Die Verknüpfung zwischen dem TEL-Derivat und den beiden PEG-Ketten erfolgt über relativ stabile Säureamid-Bindungen.

[0039] Alternativ können die PEG-Ketten durch Poly(acrylmorpholin), Poly(vinylpyrrolidon) oder Ganglioside ersetzt werden.

[0040] Bei pegylierten Liposomen, die zellspezifische Liganden tragen, stellt die Herauslösung der Lipid-Ligand-Konguate aus der Liposomenmembran ein Problem dar. Eine Verbesserung läßt sich erreichen, wenn man die Target-spezifischen Liganden an die PEG-Enden der pegylierten TEL koppelt. Denn die TEL-Derivate weisen auf Grund der membranspannenden Lipide eine bessere Verankerung auf. Dies stellt einen weiteren Vorteil von pegylierten Tetraetherlipiden bei der Verwendung in Target-spezifischen Liposomen dar.

Ligand-hydrophiles Polymer-Y-(X<sup>2</sup>)<sub>n</sub>-B-(X<sup>1</sup>)<sub>m</sub>-A



[0041] Die erfindungsgemäßen Tetraetherlipid-Ligand-Konguate sind hervorragend für zellspezifisches Targeting mit Hilfe lang zirkulierender Liposomen geeignet.

[0042] Die pegylierten Tetraetherlipide sind besonders zur Membranverankerung von großen hydrophilen Liganden geeignet, die die Tendenz der Lipid-Ligand-Konjugate in die wässrige Phase überzugehen stark erhöhen.

- [0043] Bevorzugte Liganden sind solche, die aus der Gruppe, bestehend aus Proteinen, Peptiden, Vitaminen, Kohlenhydraten und Peptidomimetika, ausgewählt sind. Das Protein ist bevorzugt ein Antikörper, ein Fragment eines Antikörpers (Fab, F(ab)<sub>2</sub> oder Fv), Lectin oder ein Apo-Lipoprotein oder ein an einen Zelloberflächenrezeptor bindendes Protein. Bei den Peptiden handelt es sich bevorzugt um Peptide mit 5 bis 15 Aminosäuren. Weitere bevorzugte Peptide sind EILDV, CDCRGDCFC, CNGRC und c(RGDfK). Bei den Vitaminen kann es sich um jedes essentielle oder nicht essentielle Vitamin handeln. Bevorzugte Vitamine sind Vitamin B12 oder Folsäure. Bei den Kohlenhydraten sind besonders bevorzugt z. B. Galactose, Lactose, Mannose oder Sialyl-Lewis-X. Erfindungsgemäß können weiterhin Peptidomimetika als Liganden eingesetzt werden; hier werden bevorzugt  $\alpha$ , $\beta$ -spezifische Diazepin-Derivate oder para-Hydroxybenzoesäureamid-Derivate verwendet.

[0044] Der Ligand kann beispielsweise eine Peptidsequenz enthalten, ausgewählt aus CDCRGDCFC (über zwei Disulfidbrücken cyclisiert), EILDV, CNGRC (über eine Disulfidbrücke cyclisiert), -c(RGDfK)- (über eine Amidbindung cyclisiert), Peptidsequenzen aus dem Circumsporozoiten-Protein und Peptidsequenzen aus Transferrin.

- [0045] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Substituenten S<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> an beiden Enden des Tetraetherlipidgrundgerüsts gleich. Dies ermöglicht, ausgehend von natürlichen Tetraetherlipiden, die Synthese ohne zwischenzeitliche Verwendung von Schutzgruppen.

- [0046] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform sind die Substituenten S<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> an beiden Enden des Tetraetherlipidgrundgerüsts verschieden. Besonders bevorzugte Ausführungsformen umfassen solche, in denen (a) S<sup>1</sup> eine kationische Gruppe und S<sup>2</sup> einen Liganden umfasst, (b) S<sup>1</sup> eine neutrale Gruppe und S<sup>2</sup> einen Liganden umfasst und (c) S<sup>1</sup> eine anionische Gruppe und S<sup>2</sup> einen Liganden umfasst. Diese Bifunktionalität der erfindungsgemäßen Tetraetherlipid-derivate, die die Anbindung eines möglicherweise für das "Targeting" verantwortlichen Liganden draußen und einer Substratbindungsstelle im Inneren eines Liposoms ermöglicht, eröffnet ungeahnte therapeutische Möglichkeiten.

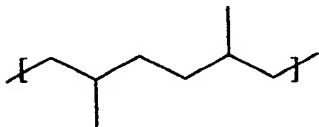
[0047] Insbesondere bevorzugt sind S<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> beide -CH<sub>2</sub>OH oder -CH<sub>2</sub>OBenzyl.

- [0048] Die Substituenten S<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> lassen sich durch gängige Syntheseverfahren verändern, verwiesen wird in diesem Zusammenhang beispielsweise auf die WO 99/10337.

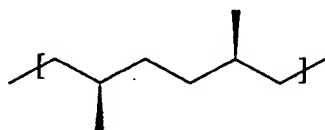
- [0049] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in Form von Salzen vorliegen. Geeignete Gegenkationen umfassen Alkalimetallionen, wie Natriumionen oder Kaliumionen, und Ammoniumionen. Geeignete Gegenanionen umfassen Halogenidionen, wie Chloridionen, Acetationen und Trifluoroacetationen. Weitere geeignete anionische Salze umfassen Fumerate, Malonate, Tartrate, Citrate, Succinate, Palmoate, Lactate und Hydrogenphosphate.

[0050] Die Substituenten R und R' stellen unabhängig voneinander in jeder der Einheiten (CRR') H oder Methyl dar. Bevorzugt ist dabei maximal jedes dritte Kohlenstoffatom der Kette (CRR')<sub>g</sub> mit einer Methylgruppe substituiert. Insbesondere bevorzugt sind sowohl R als auch R' H. Suffix g in Formel (1) ist von 12 bis 14, bevorzugt 13.

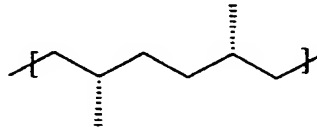
[0051] Die Mitteleinheit



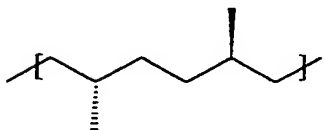
kann in den folgenden vier isomeren Konfigurationen (a) bis (d) vorliegen, von denen insbesondere die Konfiguration (a) bevorzugt ist.



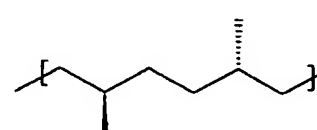
(a)



(b)

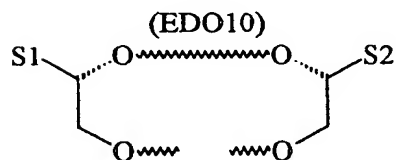
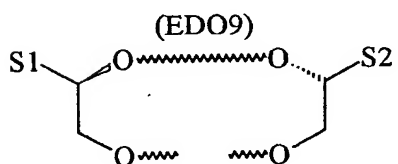
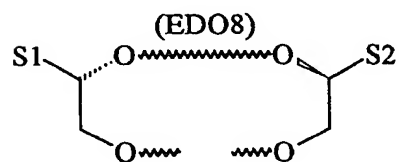
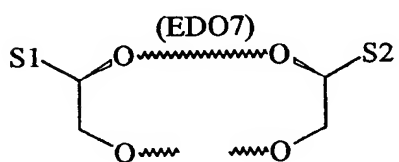
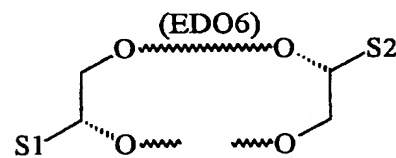
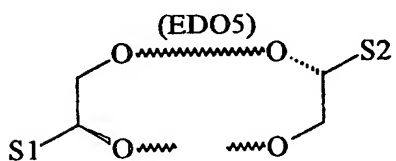
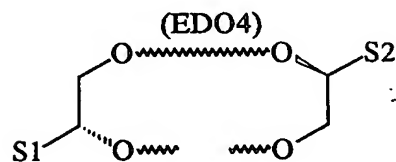
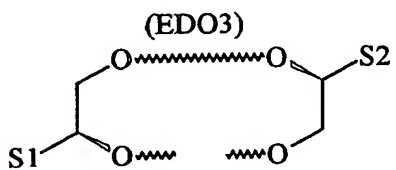
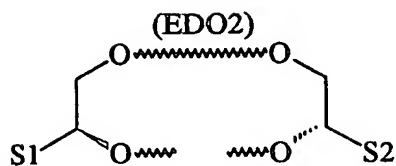
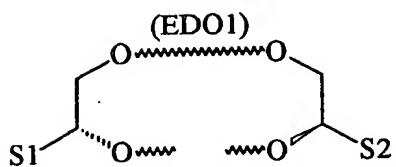


(c)

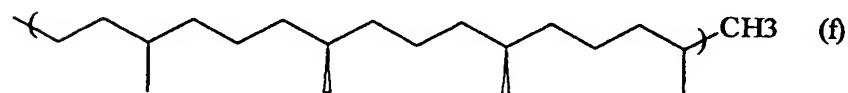
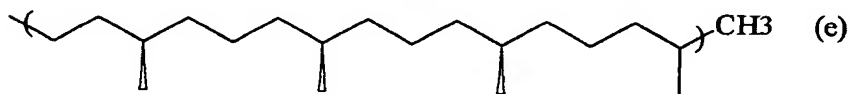


(d)

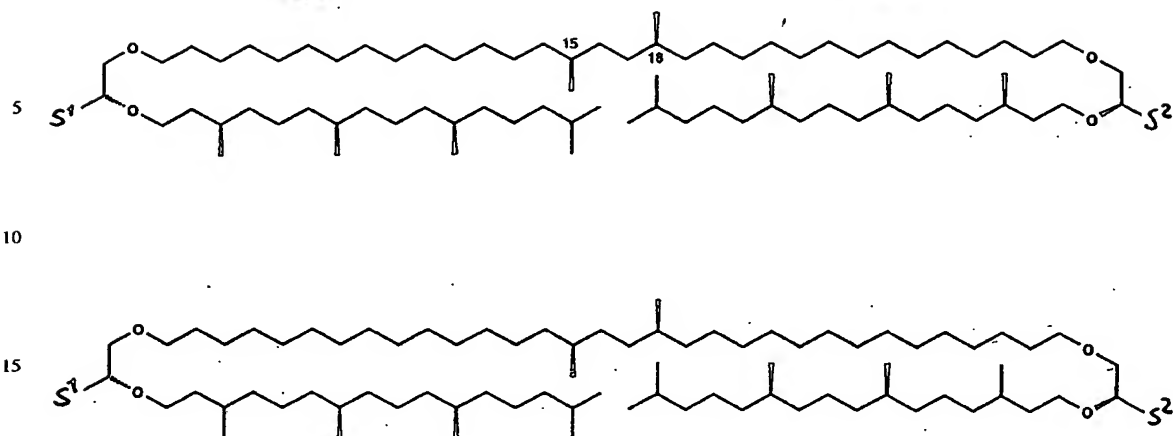
- [0052] Die Ethylendioxyeinheiten des Tetraethers der vorliegenden Erfindung liegen bevorzugt in den folgenden isomeren Konfigurationen (EDO1) bis (EDO10) vor, wobei die Konfiguration (EDO1) bevorzugt ist (Mittelteil der Tetraether der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt):



[0053] In der Gruppierung  $(CR''R''')_hCH_3$  ist  $h$  von 14 bis 16, bevorzugt 15.  $R''$  und  $R'''$  stellen unabhängig voneinander in jeder Einheit  $(CR''R''')$  H oder Methyl dar. Es ist bevorzugt wenn jede Einheit  $(CR''R''')_hCH_3$  maximal vier Methylsubstituenten aufweist. Insbesondere bevorzugt sind als Gruppierungen  $(CR''R''')_hCH_3$  die folgenden Einheiten (e) und (f).

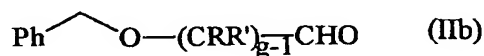
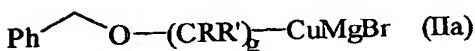
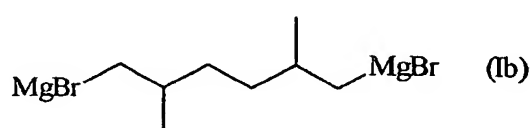
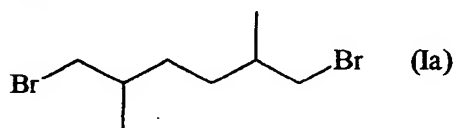


[0054] Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel (1) sind im folgenden gezeigt:

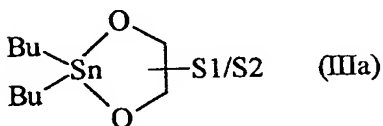


[0055] Das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren umfasst die Kopplung der Struktureinheiten (I) bis (IV) wie in Anspruch 8 gezeigt. Durch diese Synthesestrategie lassen sich die gewünschten Tetraether einfach herstellen, wobei gleichzeitig eine hohe Variabilität gesichert ist, so dass einfach unterschiedliche isomere Konfigurationen, Kettenlängen und Substitutionsmuster erhalten werden können.

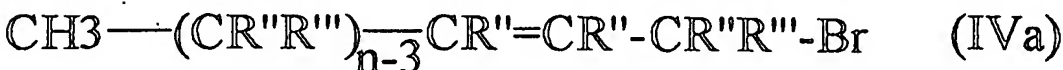
[0056] Die Kopplung der Mitteleinheit (I) mit den oberen Seitenketten (II) erfolgt bevorzugt durch die Reaktion der Einheiten (Ia) und (IIa) bzw. (Ib) und (IIb), z. B. in analoger Übereinstimmung mit den Vorschriften in Synthesis 1983, 249–282; J. Org. Chem. 1983, 48, 1767–1769 und Synthesis 1971, 303–305. Im Hinblick auf isomere Konfigurationen, Kettenlängen und Substitutionsmuster gelten die vorstehenden Ausführungen im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Tetraether.



[0057] Die Ethylendioxyeinheiten können mit dem Produkt der Kopplung der Struktureinheiten (I) und (II) verbunden werden durch Umsetzung mit einer Verbindung der Formel (IIIa), z. B. in analoger Übereinstimmung mit Biochim. Biophys. Acta 1989, 1003, 151–160. Zum Beispiel kann das Produkt der Umsetzung von (Ia) und (IIa) bzw. (Ib) und (IIb) mit (IIIa) reagiert werden, gegebenenfalls nachdem die Benzyletherereinheit im Reaktionsprodukt der Umsetzung von (Ia) und (IIa) bzw. (Ib) und (IIb) durch geeignete Reaktionsschritte umgewandelt wurde in eine Gruppierung, die im Hinblick auf eine Umsetzung mit (IIIa) reaktiv ist, wie -Br, -Cl oder -Tosylat.

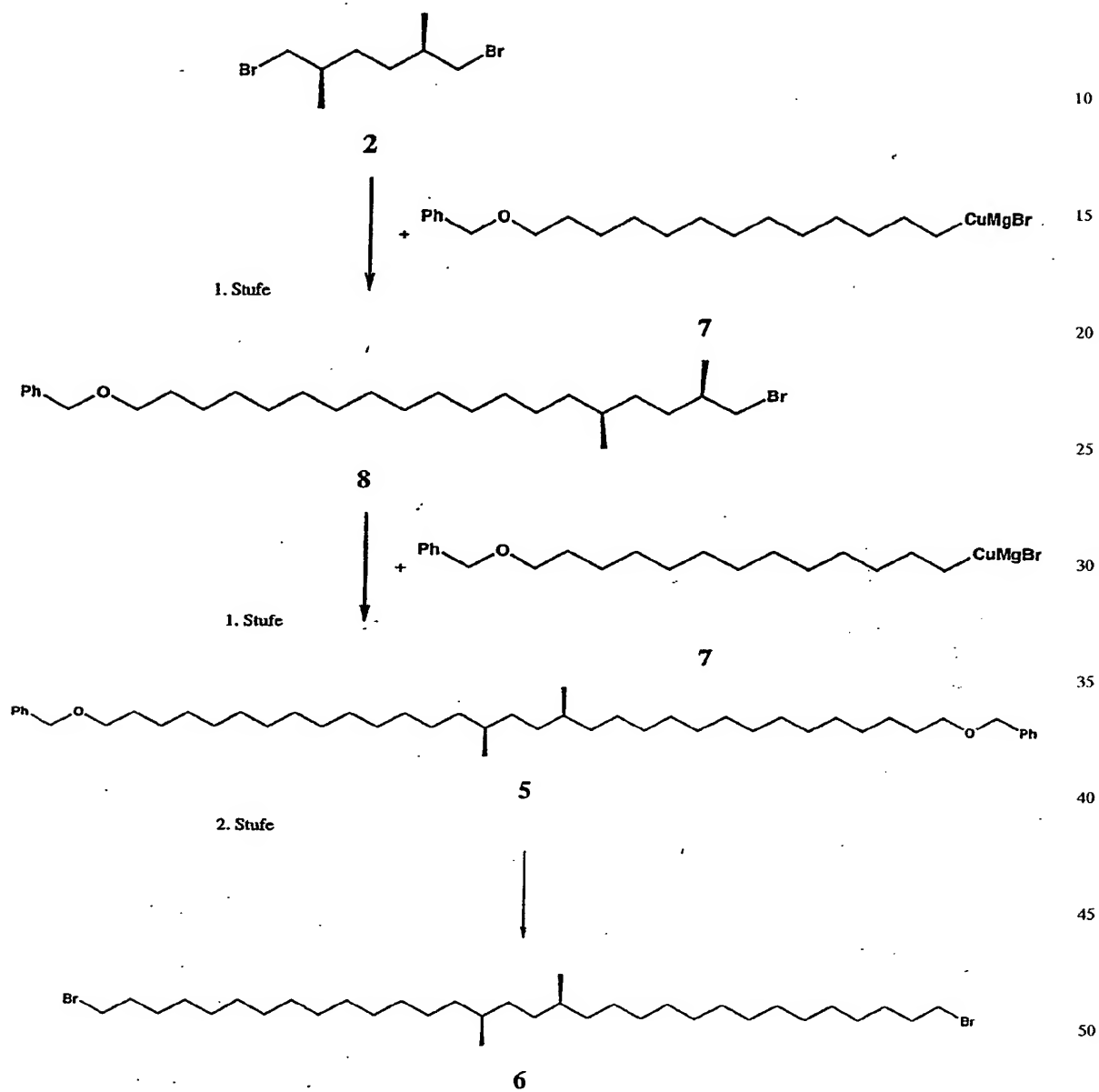


[0058] Die Kopplung der Struktureinheit (IV) mit dem Kopplungsprodukt der Struktureinheiten (I) bis (III) kann bevorzugt erhalten werden durch Reagieren des Reaktionsprodukts der vorangehenden Umsetzung mit einer Verbindung der Formel (IVa) und anschließende Hydrierung des Kopplungsprodukts, z. B. in analoger Weise nach Bull. Chem. Soc. Jpn. 1991, 64, 2088–2090. Die Verbindung (IVa) kann in verschiedenen Konfigurationen synthetisiert werden, was die Erzeugung der unterschiedlichen isomeren Konfigurationen der Ethylendioxy-Einheiten im Tetraether ermöglicht.

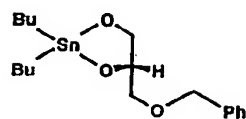


[0059] Ein bevorzugtes Herstellungsverfahren ist im folgenden angegeben. Weitere erfindungsgemäße Tetraether können durch analoge Umsetzungen erhalten werden, durch Einsatz entsprechend modifizierter Verbindungen (IIIa).

1.)

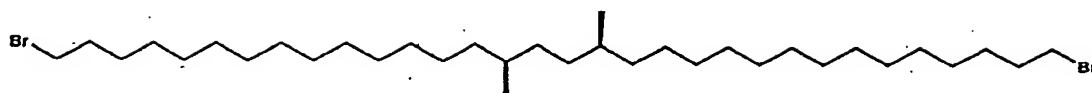


2.)

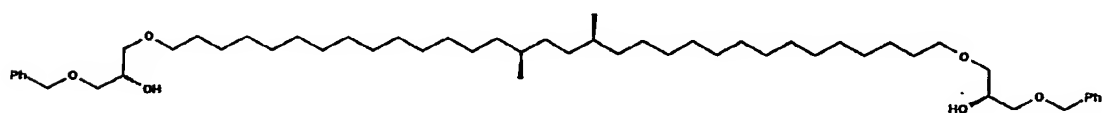


20

+

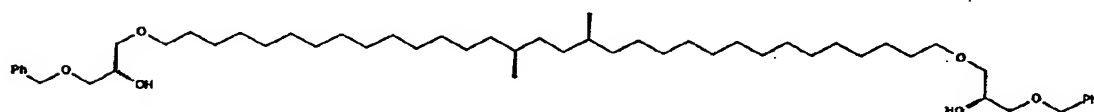


6

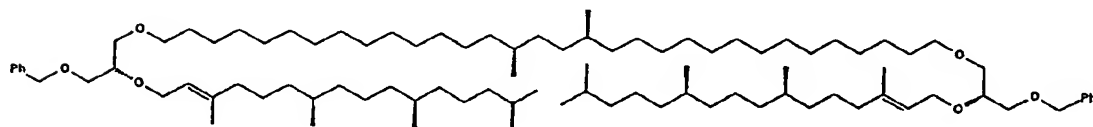


21

3.)

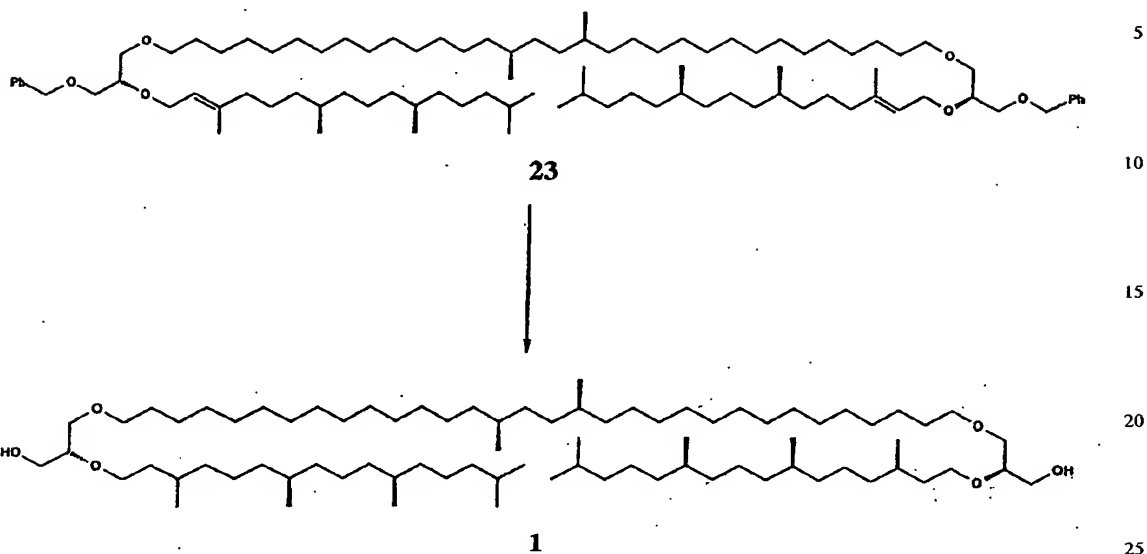


21

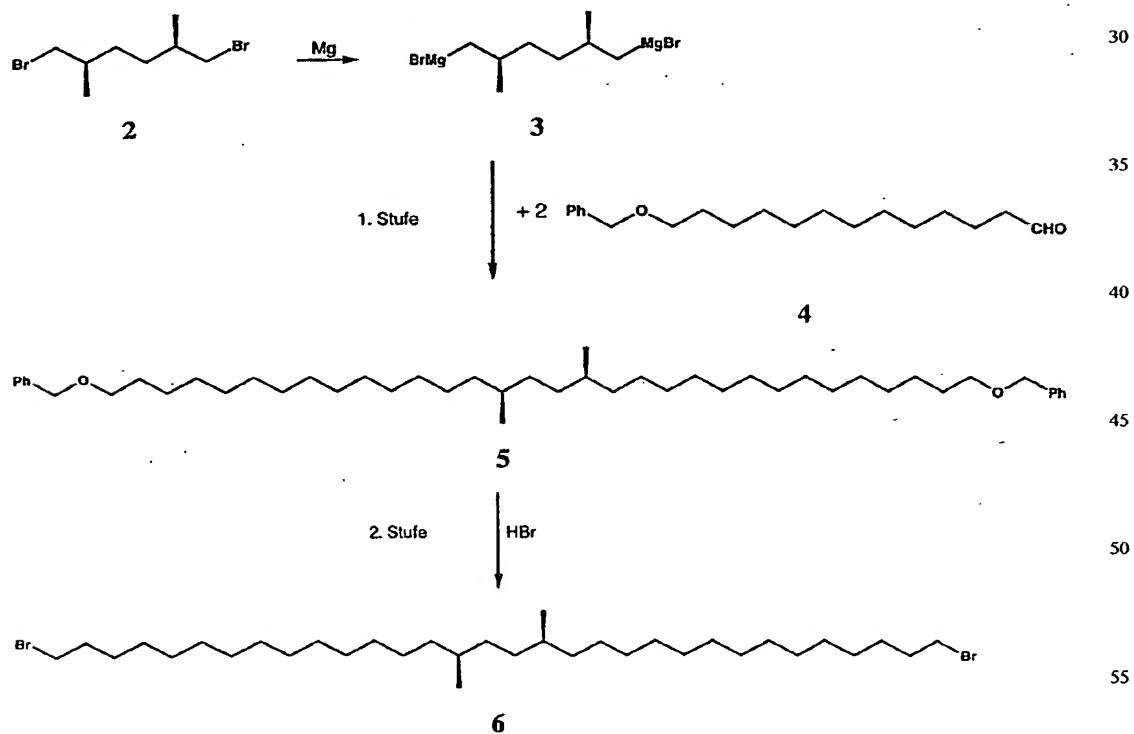


23

4.)

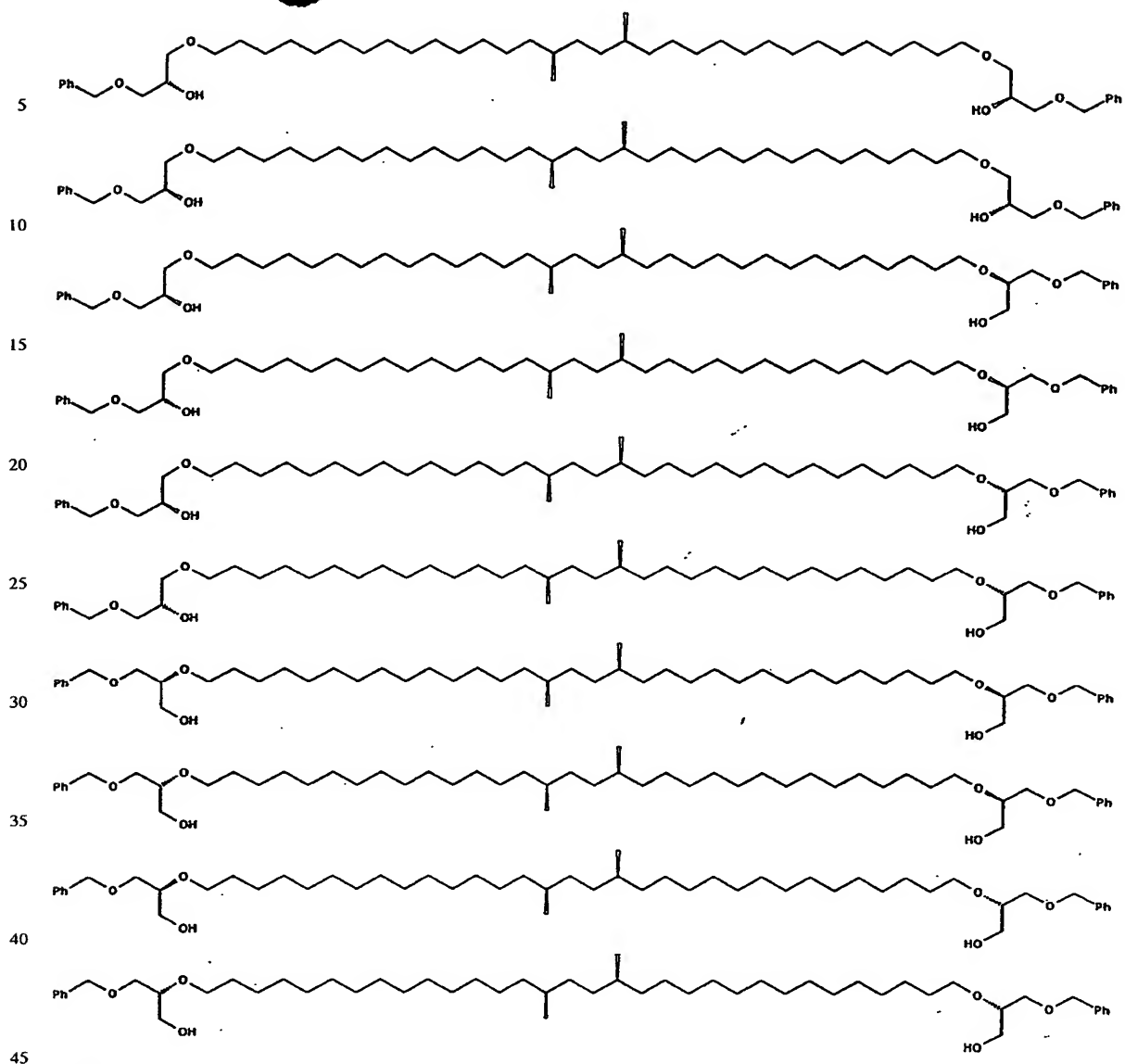


1.) Alternative



[0060] Mit unterschiedlichen Zinnverbindungen, analog zu 20 aber mit unterschiedlicher Konfiguration lassen sich in Übereinstimmung mit Reaktion 2.) auch die folgenden Substanzen herstellen.





[0061] Die jeweiligen Edukte, gezeigt in den voranstehend erläuterten Syntheseschritten können beispielsweise durch die im folgenden gezeigten Verfahren hergestellt werden. Diese Verfahren sind nicht beschränkt auf die konkret genannten Edukte sondern können in analoger Weise zur Synthese modifizierter Edukte eingesetzt werden, so dass die vorstehend im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Tetraether genannten variablen Kettenlängen und isomeren Konfigurationen erhalten werden können.

55

60

65



9

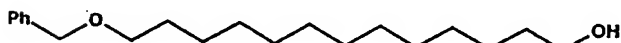
1. Stufe

LiAlH<sub>4</sub>

10

2. Stufe

BnCl



11

3. Stufe

DMSO



4

[0062] Tridecandisäure 9 (Merck) wird mit Lithiumaluminiumhydrid zum Tridecandiol 10 reduziert. Das Diol 10 wird ohne weitere Reinigung mit Benzylchlorid in Gegenwart von Kaliumhydroxid einseitig geschützt. Das durch Chromatographie gereinigte monobenzyloxygeschützte Diol 11 wird durch Swern-Oxidation mit Dimethylsulfoxid und Oxalylchlorid zum Aldehyd 4 oxidiert und durch Chromatographie gereinigt.

Ausbeute (1. Stufe): 93%

Ausbeute (2. Stufe): 42%

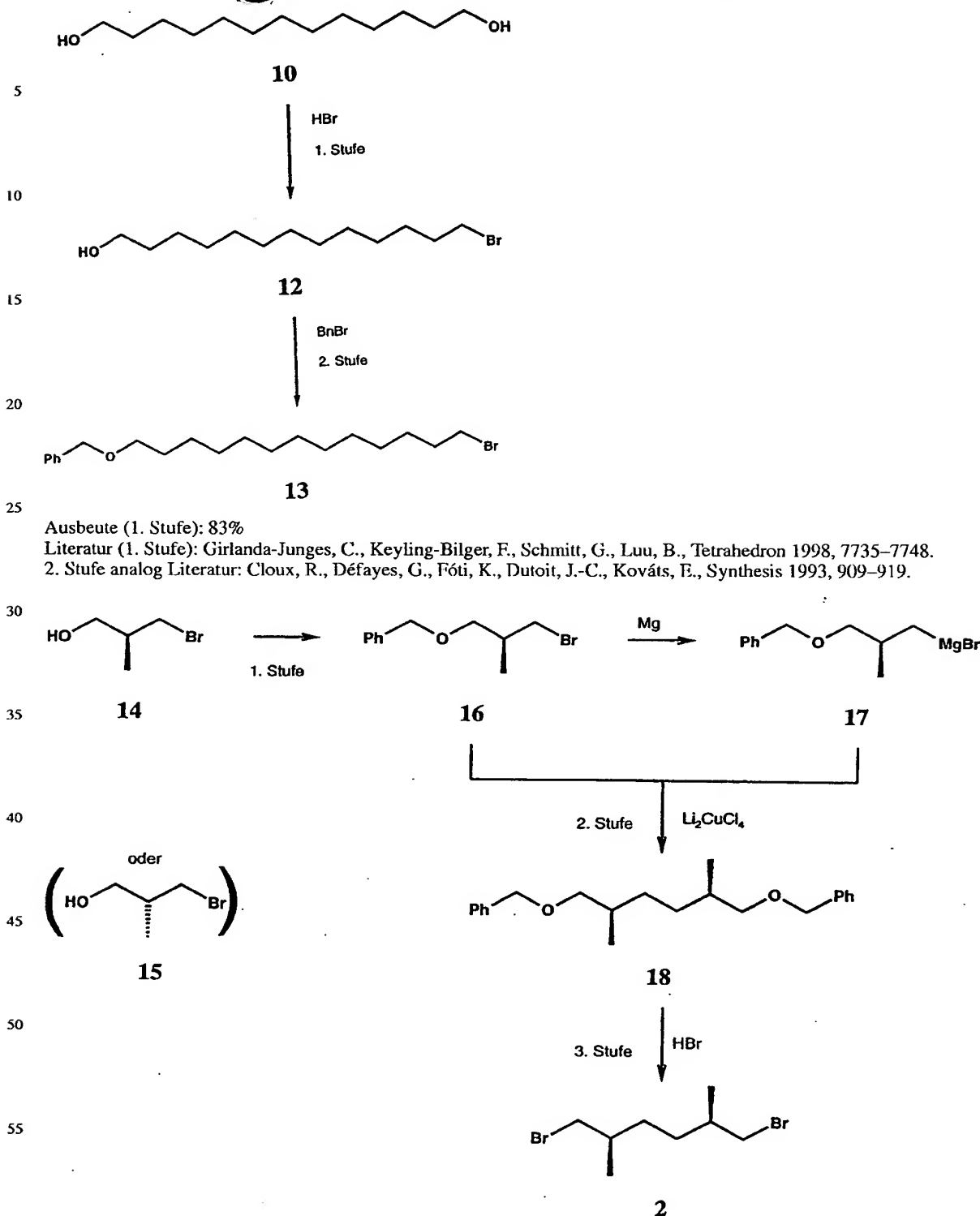
Ausbeute (3. Stufe): 60%

Literatur (1. Stufe): Girlanda-Junges, C., Keyling-Bilger, F., Schmitt, G., Luu, B., Tetrahedron 1998, 7735-7748.

2. Stufe analog Literatur: Emde, U., Koert, U., Eur. J. Org. Chem. 2000, 1889-1904.

3. Stufe analog Literatur: Mancuso, A. J., Swern, D., Synthesis 1981, 165-185

[0063] Ein alternativer Reaktionsweg ist die Umsetzung des monobenzyloxygeschützten Diols 11 zur Bromverbindung 13, die dann für die Kopplungsreaktion als Magnesiumcuprat aktiviert wird (Verbindung 7) (siehe 2.).



[0064] Die Hydroxylgruppe des chiralen Ausgangsmaterials 14 (Aldrich; beide Enantiomere 14 und 15) wird durch Einführung einer Benzylschutzgruppe geschützt. Anschließend wird die Bromverbindung 16 mit Magnesium aktiviert und in Gegenwart von Kupfer- und Lithiumchlorid mit einer weiteren Bromverbindung 16 (der gleichen oder dem Enantiomer) umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Chromatographie. Die Umsetzung mit Bromwasserstoffsäure liefert die Dibromverbindung 2.

Literatur (Daten) (1. Stufe): Branca, Q., Fischui, A., Helv. Chim. Acta 1977, 60, 925-944.

1. Stufe analog Literatur: Cloux, R., Défayes, G., Fóti, K., Dutoit, J.-C., Kováts, E., Synthesis 1993, 909-919.

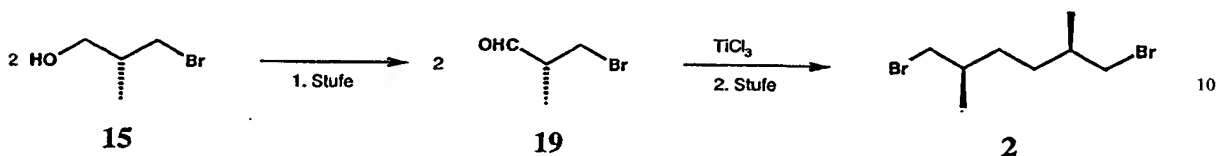
Oder: Voss, G., Gerlach, H., Helv. Chim. Acta 1983, 66, 2294-2307.

2. Stufe analog Literatur: Volkmann, R., Davis, J. T., Meltz, C. N., J. Org. Chem. 1983, 48, 1767: 1769.

Oder: Tamura, M., Koch, J., Synthesis 1971, 303-305.

3. Stufe analog Literatur: Bhatt, M. V., Kulkarni, S. U., Synthesis 1983, 249-282.

[0065] Ein alternativer Reaktionsweg ist die Oxidation der Hydroxylgruppe der Verbindung 15 (auch hier können beide Enantiomere 14 und 15 eingesetzt werden) zur Aldehydfunktion. Die Dimerisierung erfolgt über eine McMurray-Kupplung mit Titantrichlorid und anschließender Hydrierung.



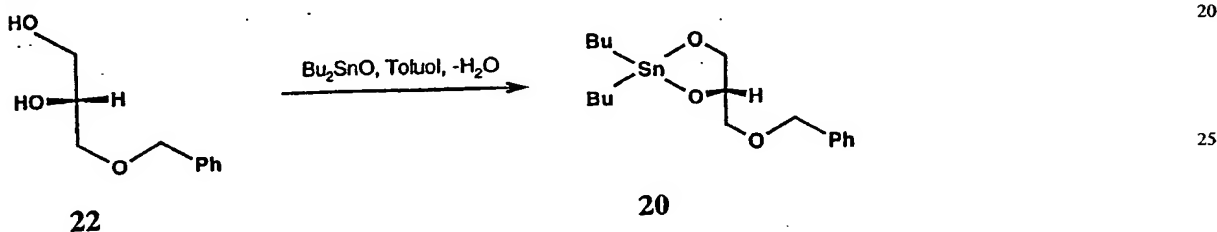
1. Stufe analog Literatur: Mancuso, A. J., Swem, D., Synthesis 1981, 165-185.

Oder: Pennings, M. L. M., Reinhoudt, D. N., J. Org. Chem. 1983, 48, 4043-4048.

Oder: Chari, R. V. J., Kozarich, J. W., J. Org. Chem. 1982, 47, 2355-2358.

2. Stufe analog Literatur: McMurray, J. E., Chem. Rev. 1989, 89, 1513-1524.

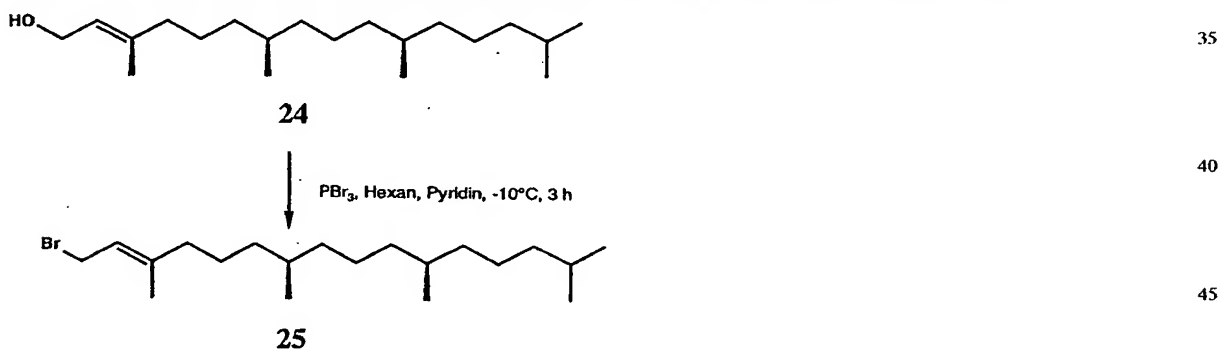
Oder: Lenoir, D., Synthesis 1989, 883-897.



[0066] Die beiden freien Hydroxylgruppen von 3-O-Benzyl-sn-glycerol 22 (Sigma) werden mit Dibutylzinnoxid in Toluol am Wasserabscheider umgesetzt. Das Produkt 20 wird durch Kristallisation gereinigt.

Ausbeute: 67%

Literatur: Yamauchi, K., Une, F., Tabata, S., Kinoshita, M., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1986, 765-770.



[0067] Phytol 24 (Merck) wird mit Phosphortribromid und n-Hexan und Pyridin zum Phytylbromid 25 umgesetzt.

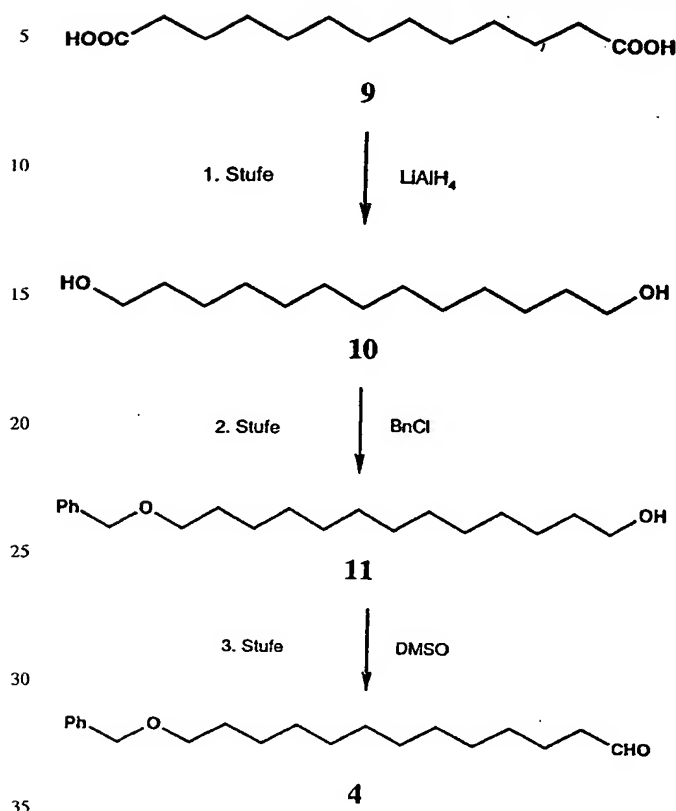
Ausbeute: 91%

Literatur: Yamauchi, K., Yamada, K., Kinoshita, M., Kamikawa, T., Bull. Chem. Soc. Jpn. 1991, 64, 2088-2090.

[0068] Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin ein Zwischenprodukt in Übereinstimmung mit Anspruch 13 zur Verfügung. Dieses Zwischenprodukt ist geeignet zum Einsatz bei der Synthese der erfindungsgemäßen Tetraether. Dieses Zwischenprodukt ist ein Schlüsselelement bei der Synthese der erfindungsgemäßen Tetraether. Die beiden im Zwischenprodukt vorgesehenen Methylgruppen verleihen dem Tetraether die notwendige Starrheit, so dass keine U-förmige Konformation angenommen wird. Durch einfache Modifikationen bei der Synthese, die oben exemplarisch gezeigt ist, kann die isomere Konformation des Zwischenprodukts gesteuert werden, was die einfache Synthese von verschiedenen erfindungsgemäßen Tetraethern sichert.

[0069] Im folgenden werden beispielhaft einige Syntheseschritte einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung gezeigt.

## 1 Synthese der Seitenketten der 32er Kette des synthetischen Tetraethers



## 1.1 Synthese des Tridecandiols (10)

40 Ansatz: 9.00 g (36.8 nmol) Tridecandisäure (9)  
Durchführung siehe Literatur: Girlanda-Junges, C., Keyling-Bilger, F., Schmitt, G., Luu, B., Tetrahedron 1998, 7735–7748.  
Ausbeute: 7.39 g (93%), farbloser Feststoff.

## 1.2 Synthese des 13-Benzyl-tridecan-1-ol (11)

[0070] 2.50 g (11.6 nmol) Tridecandiol (10) und 675 mg (12.0 mmol) gepulvertes wasserfreies Kaliumhydroxid werden unter Stickstoffatmosphäre mit 1.32  $\mu\text{l}$  (1.45 mg) (11.5 mmol) Benzylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wird zügig auf 110°C erhitzt und 5 h bei der Temperatur gerührt.  
50 [0071] Nach dem Abkühlen (45 min) wird das Reaktionsgenüsch in je 20 ml Chloroform und Wasser gelöst. Die Phasen werden getrennt und die wäßrige Phase wird fünf mal mit je 15 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.  
[0072] Der Feststoff wird durch Kieselgelchromatographie (140 g Kieselgel, Merck, 0.04–0.063 mm) gereinigt:

## Fließmittel

- 1) Petrolether 60–95°C/tert.-Butylmethylether (5 : 1) (Elution des Nebenprodukts).
- 2) Petrolether 60–95°C/tert.-Butylmethylether (1 : 1) (Elution des Produkts).
- 3) tert.-Butylmethylether (Elution des Produkts).

60 [0073] Der Chromatographieverlauf wird durch Dünnschichtchromatographie verfolgt:  
Fließmittel: Petrolether 60–95°C/tert.-Butylmethylether (1 : 1).  
Nebenprodukt:  $R_f = 0.66$   
Produkt:  $R_f = 0.02$   
65 Ausbeute: 1.51 g (42%), farbloses Öl.  
IR (NaCl): ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3271 (O-H), 3031 (C-H, Aryl), 2918, 2849 (C-H, Aliph.), 1463, 1454 (C-H), 1107, 1074 (C-O).  
MS (CI+): theoretische Masse: 306,492;  $m/z = 307,4 [M + 1]$

## 1.3 Synthese von 13-Benzyl-tridecan-1-al (4)

[0074] 80.0 ml (120 mg) (945  $\mu\text{mol}$ ) Oxalylchlorid, gelöst in 1 ml wasserfreiem Dichlormethan, werden unter Stickstoffatmosphäre mit einer Isopropanol-Trockeneismischung auf ca.  $-60$  bis  $-70^\circ\text{C}$  gekühlt. Die Lösung wird mit 136 -I (150 mg) (1.92 mmol) Dimethylsulfoxid, gelöst in 200  $\mu\text{l}$  Dichlormethan, versetzt. Der Ansatz wird 2 min bei der Temperatur gerührt und anschließend mit einer Eis-Kochsalz-Mischung auf  $-10^\circ\text{C}$  gekühlt. Die Reaktionsmischung wird mit 123 mg (401  $\mu\text{mol}$ ) 13-Benzyl-1-tridecanol (11), gelöst in 400  $\mu\text{l}$  Dichlormethan, versetzt und 15 min gerührt. Anschließend wird der Ansatz langsam mit 280  $\mu\text{l}$  (204 mg) (2.02 mmol) Triethylanilin versetzt und weitere 5 min gerührt.

[0075] Nachdem sich der Ansatz unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt hat (30 min), wird er mit 3 ml Wasser hydrolysiert und mit 10 ml Chloroform versetzt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird drei mal mit je 2 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden jeweils mit je 10 ml 1%iger Salzsäure, 5%iger Natriumcarbonatlösung und mit Wasser gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

[0076] Der Feststoff wird durch eine Kieselgelchromatographie (10 g Kieselgel, Merck, 0.04–0.63 mm) gereinigt: Fließmittel: Petrolether 60–95 $^\circ\text{C}$ /tert.-Butylmethylether (1 : 1)

[0077] Der Chromatographieverlauf wird durch Dünnschichtchromatographie verfolgt: Fließmittel: Petrolether 60–95 $^\circ\text{C}$ /tert.-Butylmethylether (1 : 1) Nebenprodukt:  $R_f = 0.67$

Produkt:  $R_f = 0.56$

Ausbeute: 73.6 mg (60%), farbloses Öl.

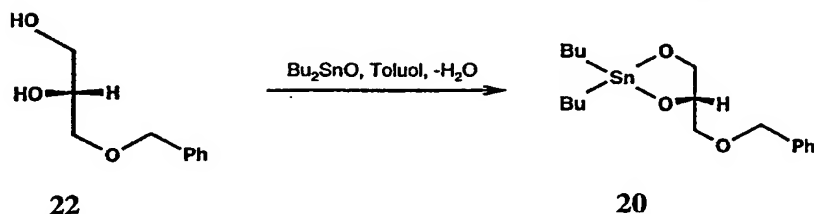
IR (NaCl): ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3087, 3063, 3030 (C-H, Aryl), 2926, 2853 (C-H, Aliph.), 1726 (C = O, Aldehyd), 1454 (C-H), 1102 (C-O).

MS (CI+): theoretische Masse: 304,476;  $m/z = 305,5$  [M + 1]

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.3$  (m, 16H,  $\text{CH}_2$ ), 1.6 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.41 (t; d, 1 = 8.0; 2.0 Hz, 2H,  $\text{OHC-CH}_2$ ), 3.46 (t, J = 6.7 Hz, 2H,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 4.50 (s, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{O}$ ), 7.33 (br. s, 3H,  $\text{ArH}$ ), 7.34 (br. s, 2H,  $\text{ArH}$ ), 9.75 (t, J = 2.0 Hz, 1H, CHO).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 22.1, 26.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.8$  (9C,  $\text{CH}_2$ ), 43.9 (1C,  $\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 70.5 (1C,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 72.8 (1C,  $\text{Ar-CH}_2\text{-O}$ ), 127.4, 127.5, 128.3 138.7 (6C,  $\text{ArC}$ ), 203.0 (1C, CHO).

## 2 Synthese von 1,2-O-(Dibutylstannyl)-3-O-benzyl-sn-glycerin (20)

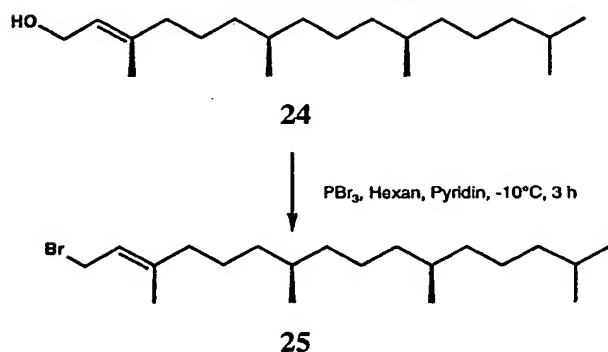


Ansatz: 1.00 g (5.50 mmol) 3-O-Benzyl-sn-glycerin (22)

Durchführung siehe Literatur: Yamauchi, K., Une, F., Tabata, S., Kinoshita, M., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1986, 765–770.

Ausbeute: 1.53 g (67%), farbloser Feststoff.

## 3 Synthese von (7R,11R)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecenylbromid (25)



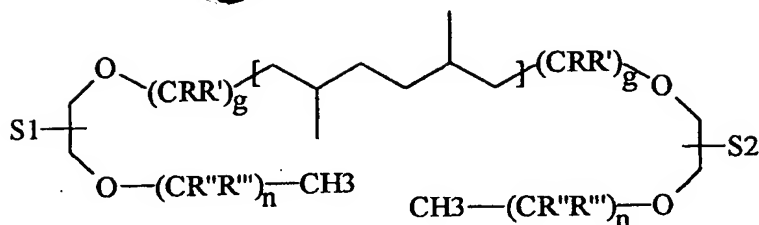
Ansatz: 8.00 ml (6.81 g) (23.0 mmol) Phytol (24)

Durchführung siehe Literatur: Yamauchi, K., Yamada, K., Kinoshita, M., Kamikawa, T., Bull. Chem. Soc. Jpn. 1991, 64, 2088–2090.

Ausbeute: 7,50 g (91%), farbloses Öl

## Patentansprüche

1. Tetraether der allgemeinen Formel (1), oder Salze davon



wobei g eine ganze Zahl von 12 bis 14 ist, h eine ganze Zahl von 14 bis 16 ist, R und R' unabhängig voneinander H oder Methyl darstellen, R" und R''' unabhängig voneinander H oder Methyl darstellen, die beiden Substituenten S<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> unabhängig voneinander -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OTHP (THP = Tetrahydropyran) oder -CH<sub>2</sub>OBenzyl darstellen oder ausgewählt werden unter Gruppen der Formel

$$-A-(X^1)_r-B-(X^2)_q-Y$$

worin bedeuten:

A -CONR<sup>1</sup>-, -COO-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>OCO-, -CH<sub>2</sub>OCOO-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>1</sup>CO-, -CH<sub>2</sub>OCONR<sup>1</sup>-, CH<sub>2</sub>NR<sup>1</sup>COO-, -CON[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>Y]-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>OOCO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-, -CH<sub>2</sub>COO-, -CH<sub>2</sub>O(PO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>)O- oder -CH<sub>2</sub>S-,

$X^1$  und  $X^2$  unabhängig voneinander eine verzweigte oder unverzweigte Alkyl- oder Alkenylengruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen,  $-\text{COCR}^Y(\text{CH}_2)_m-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCOCHY}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{NHCOCHY}-$ ,  $-[(\text{CH}_2)_m\text{O}]_n-$ ,  $-[(\text{CH}_2)_m\text{O}]_n\text{CO}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{NH}-$  oder  $-(\text{CH}_2)_m\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m-$ .

$$\text{B} - [(\text{CH}_2)_m\text{O}]_n - , - [\text{O}(\text{CH}_2)_m]_n - , - [\text{NR}^1\text{COCHN}(\text{R}^1)_2]_o - \text{oder} - (\text{NR}^6)_p - ,$$

Y -H, -R<sup>2</sup>, -NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, -N<sup>+</sup>R<sup>2</sup>R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>Y]<sup>2</sup>, -NR<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>Y, -OR<sup>5</sup>, -COR<sup>7</sup>, -NHC(NH)NH<sub>2</sub>, -NHCOY oder -SR<sup>8</sup>, wobei Y innerhalb einer Gruppe verschiedene Bedeutungen haben kann.

R<sup>1</sup> und R<sup>6</sup> -H, eine geradkettige, verzweigte oder cyclische Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei diese Gruppen mit mindestens einer Gruppe Y substituiert sein können, oder - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHR<sup>2</sup>,

 $\mathbb{R}^2$  bis  $\mathbb{R}^5$ ,

$R^7$  und  $R^8$  unabhängig voneinander  $R^1$  oder  $-(C=N^+H_2)NH_2$ .

m 1 bis 5, wobei m innerhalb einer Gruppe verschiedene Werte annehmen kann,

n 0 bis 150,

o 0 bis 10,

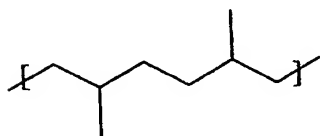
$p = 0$  oder  $1$ .

q 0 bis 5 und

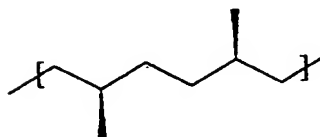
r 0 oder 1,

wobei jeweils einer der Reste  $R^2$  bis  $R^5$ ,  $R^7$  und  $R^8$  weiter einen Liganden umfassen kann, der über einen Spacer an das Lipid gebunden sein kann.

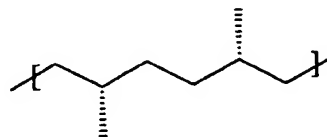
2. Tetraether nach Anspruch 1, wobei die Einheit



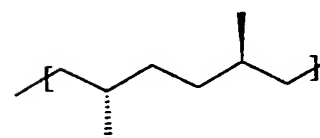
eine der folgenden Konfigurationen (a) bis (d) aufweist.



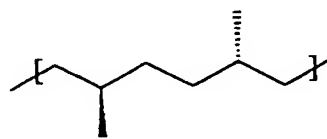
(a)



(b)



(c)

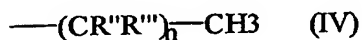


(d)

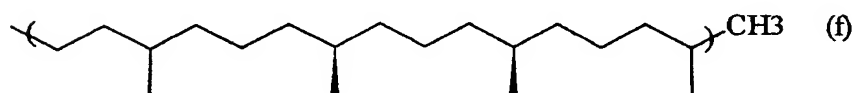
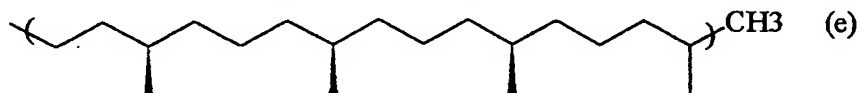
3. Tetraether nach Anspruch 1 oder 2, wobei g 13 ist.

4. Tetraether nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, wobei  $h$  15 ist.

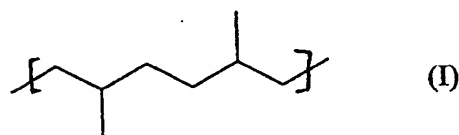
5. Tetraether nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei R und R' H darstellen.  
 6. Tetraether nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, wobei S<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> beide -CH<sub>2</sub>OBenzyl darstellen.  
 7. Tetraether nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Gruppierung



ausgewählt ist unter den folgenden Gruppierungen (e) und (f).



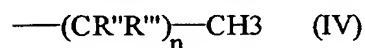
8. Verfahren zur Herstellung eines Tetraethers nach einem der vorstehenden Ansprüche, umfassend das Herstellen einer Kopplung einer Struktureinheit der Formel (I) mit zwei Struktureinheiten der Formel (II)



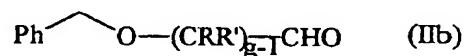
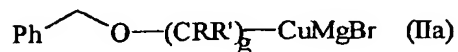
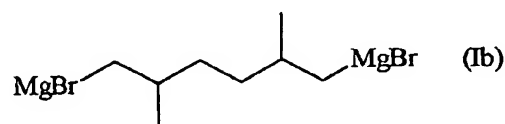
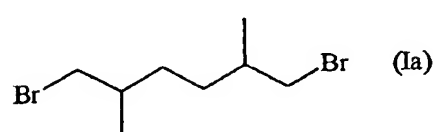
anschließende Kopplung der im vorstehenden Schritt erhaltenen gekoppelten Struktureinheit mit zwei Struktureinheiten der Formel (III)



und anschließende Kopplung der erhaltenen Struktureinheit mit zwei Struktureinheiten der Formel (IV).

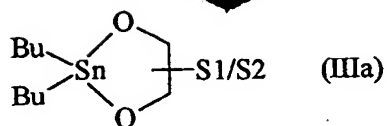


9. Verfahren nach Anspruch 8 wobei die Kopplung der Struktureinheiten (I) und (II) erfolgt durch Umsetzung von einer Einheit der Formel (Ia) bzw. (Ib) mit zwei Einheiten der Formel (IIa) bzw. (IIb).

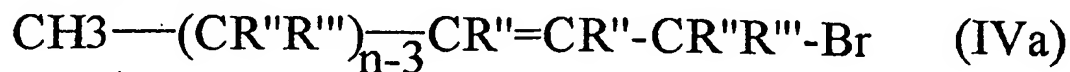


10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Kopplung der Struktureinheiten der Formel (III) erfolgt durch Umsetzung des Reaktionsprodukts der Kopplung der Struktureinheiten (I) und (II) mit zwei Einheiten der Formel (IIIa)

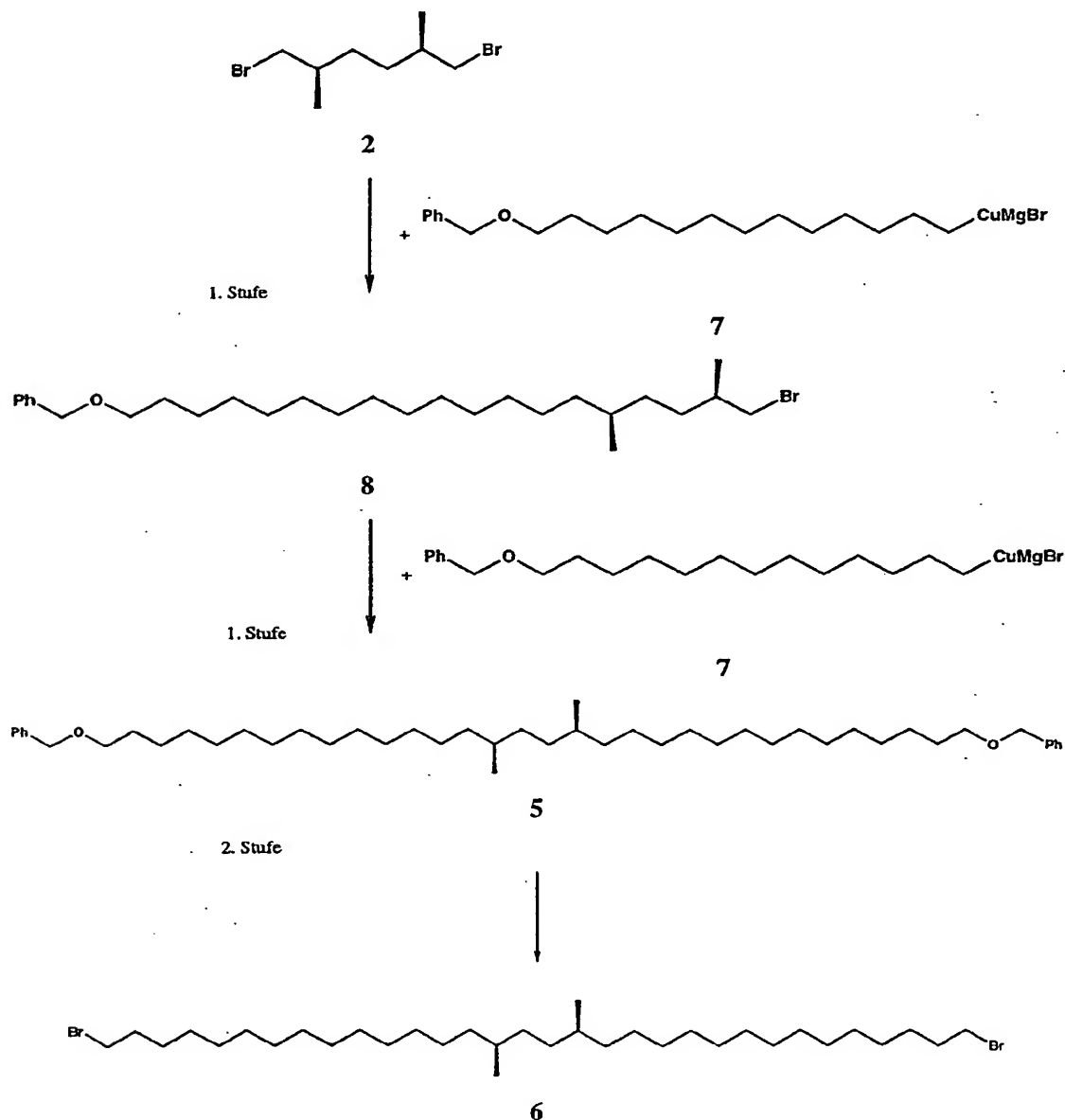


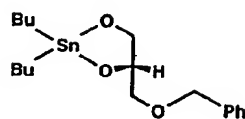


11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, wobei die Kopplung der Struktureinheiten (IV) erfolgt durch Umsetzung des Reaktionsprodukts der Kopplung der Struktureinheiten (I) bis (III) mit zwei Einheiten (IVa) und mit anschließender Hydrierung.



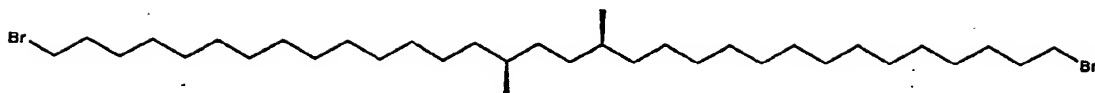
12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 8 bis 11, umfassend die folgenden Stufen:



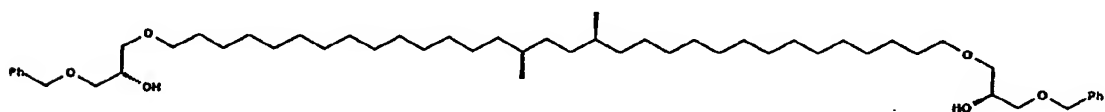


20

+

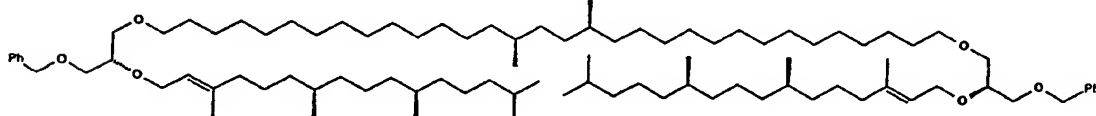


6

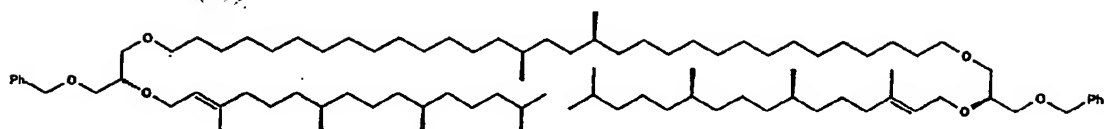


21

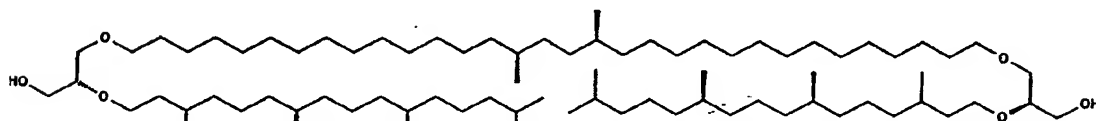
21



23

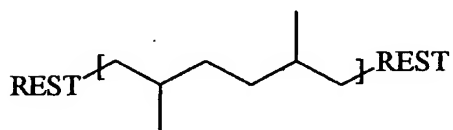


23



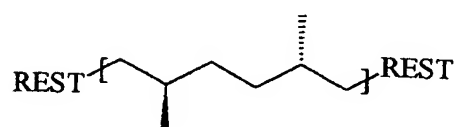
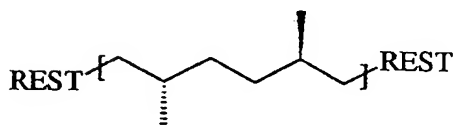
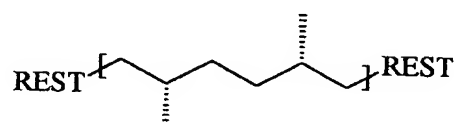
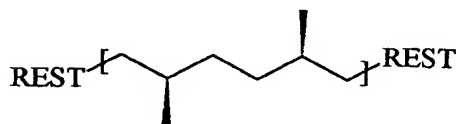
1

13. Zwischenprodukt der Formel



wobei REST ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus -OH, -OPhenyl, -OBenzyl, -MgBr, -I, -Br und -Cl.

14. Zwischenprodukt nach Anspruch 13, wobei das Zwischenprodukt die folgende Konfiguration aufweist.



15. Zwischenprodukt nach Anspruch 13 oder 14 wobei REST Br darstellt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**